

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP99/04167 is a true and complete translation of the above identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 31st day of March, 2000

Full name of the translator: Kiyoshi MURAKAMI

Signature of the translator:

Kiyoshi Murakami

Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,  
New Ohtemachi Bldg., 2-1,  
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,  
Tokyo, JAPAN

0008709-2006-00000000-00000000

—



Q2

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP99/04167

REC'D 17 SEP 1999

03/08/99 PCT

EKV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 8月 4日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第220060号

出 願 人

Applicant (s):

日本たばこ産業株式会社

097509945

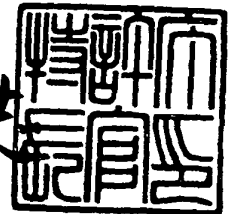
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3058016

【書類名】 特許願

【整理番号】 980687

【提出日】 平成10年 8月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 浜田 和行

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内

【氏名】 中木戸 文夫

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2番 1号 新大手町ビル 206区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100092886

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 清

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 バルナーゼをコードする遺伝子において、該遺伝子の DNA 配列の少なくとも一部に変異を有することにより、該変異遺伝子を植物中で葯特異的に発現させたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することができる、変異バルナーゼ遺伝子。

【請求項 2】 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする DNA 配列において、1 または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加され、かつ植物中で葯特異的に発現させたとき当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とするタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする DNA 配列において、1 または数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入または付加された DNA 配列であって、その上流に葯特異的な発現をもたらすプロモーター配列を有し、植物ゲノム中に導入されたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする遺伝子。

【請求項 4】 配列番号 3 で示され、かつ植物中で葯特異的に発現させたとき当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とするタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 5】 配列番号 3 で示される配列、およびその上流に存在して葯特異的な発現をもたらすプロモーター配列を有し、植物ゲノム中に導入されたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することを特徴とする遺伝子。

【請求項 6】 請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含み、宿主植物中で該遺伝子を発現することができる組換えベクター。

【請求項 7】 請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか 1 項に記載の変異バルナーゼ遺伝子を用いて植物を形質転換し、該変異バルナーゼ遺伝子を葯特異的に発現させることにより当該植物を雄性不稔化する方法。

【請求項 8】 変異バルナーゼ遺伝子による植物の形質転換が、該遺伝子を植物のゲノムへ組み込むことにより行われる、請求項 7 の方法。

【請求項9】 請求項1ないし請求項5のいずれか1項に記載の遺伝子を導入した形質転換植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物の特定部位、特に蒴に特異的に発現させることにより、効率よく雄性不稔形質転換体を得られる変異バルナーゼ遺伝子に関する。本発明はまた、本発明の変異バルナーゼ遺伝子を、宿主細胞中で発現することができる組換えベクター、該ベクターにより形質転換された植物、および形質転換植物の作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

バルナーゼ (barnase) はバチルス・アミロリクイファシエンス (Bacillus amyloliquifaciens) 由来のRNA分解酵素 (RNase) である (S. Nishimura and M. Nomura, Biochem.Biophys.Acta 30, 430-431:1958; R.W. Hartley, J.Mol.Biol., 202, 913-915:1988)。本酵素はアミノ酸残基110個を有し、RNAを加水分解する酵素である。本酵素が細胞内で発現すると、その強力なRNA分解活性により細胞機能が阻害され、多くの場合細胞は死滅する。しかしながら、バルナーゼの遺伝子を植物の所定の部位に発現させることができれば、所定の部位の機能を選択的に抑制することができる。

【0003】

PCT出願国際公開第8910396号には、上記のバルナーゼ遺伝子を蒴組織のタペータム細胞に特異的な発現プロモーターの下流に結合して作成した雄性不稔遺伝子を植物に導入し、雄性不稔植物を得る技術が報告されている。このような雄性不稔化技術は効率の良いF1ハイブリッド品種の開発において非常に有用である。

【0004】

しかし、バルナーゼ遺伝子を雄性不稔遺伝子として使用した場合には、雄性不稔形質転換体が、好ましくない形質を示す場合がしばしば観察されている。PC

T出願国際公開第9626283号にはイネにおけるこのような問題が述べられているが、イネだけでなくレタスにおいても同様な現象が報告されている (Scientia Horticulturae 55, 125-139:1993; Arlette Reymaerts, Hilde Van de Wiele, Greta De Sutter, Jan Janssens: Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed production)。その報告によるとタバコ由来の薬特異的プロモーター (TA29) とバルナーゼを用いた雄性不稔遺伝子をレタスに導入した場合、活力の低下した植物体が現れる。

【0005】

このような現象の正確な原因は解明されていないが、たとえば、いわゆる遺伝子導入部位の「位置効果」の影響がそのメカニズムとして想定されている (PCT出願国際公開第9626283号)。すなわち、より具体的には、雄性不稔遺伝子が目的とする部位である葯でのみ発現すれば希望する雄性不稔植物が作成できるが、当該遺伝子の導入部位近傍に存在する内在性のエンハンサー等の発現調節因子の影響で葯組織以外でもバルナーゼがごく微量発現する可能性がある。このような場合、酵素活性が強力であるために、上述した好ましくない形質が現れることが考えられる。

【0006】

この問題を克服するために、PCT出願国際公開第9626283号にはまた、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (以下、CaMV35Sプロモーターという) の、葯以外の組織で強力に発現するという性質を利用した次のような方法が記載されている。すなわち、バルナーゼに対する阻害タンパク質であるバースター (barstar) を使用する方法であり、CaMV35Sプロモーターに結合したバースター遺伝子を植物体に同時に導入して葯以外の組織でバースター遺伝子を構成的に発現させることにより、葯以外におけるバルナーゼの影響を排除するというものである。しかしながら、この方法ではバルナーゼ遺伝子のみならず、バースター遺伝子を導入しなければならず、植物体に複数の外来遺伝子を導入することになる。植物では複数コピーの外来遺伝子を導入することにより、その遺伝子の発現が抑制されるというジーンサイレンシング (gene silencing) の問題が知られており、現在のところそのメカニズムは明確でないものの、特に外来遺伝子を35Sプロ



モーターにより発現させた場合にこの問題が起こりやすいとされている (R.B. Flavell, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91, 3490-3496:1994; J. Finnegan, Bio.Technology 12, 883-888:1994; M.A. Matzke and A.J.M. Matzke, Plant Physiol., 107, 679-685:1995)。一方、バルナーゼを利用した雄性不稔遺伝子を、イネやトウモロコシなどの種子を利用する作物のF1品種育成に用いる場合には、花粉親(父親)に「雄性回復遺伝子」としてバースター遺伝子を保持させることにより、F1世代で花粉の稔性を回復させるという方法が採られている (C. Mariani, et al., Nature 357, 384-387:1992)。そのため、前述のW096/26283のような方法でMS植物(母親)を作成した場合には、F1植物において複数コピーのバースター遺伝子が存在することになり、ジーンサイレンシングの影響で、その発現が抑制されてしまうおそれが生じる。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、バースター遺伝子を用いることなくバルナーゼ遺伝子により雄性不稔植物を作出する方法を提供する。

#### 【0008】

本発明は、上記方法に使用する変異バルナーゼ遺伝子およびその製造方法も提供する。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明においては、バルナーゼ遺伝子のDNA配列 (R.W. Hartley, J.Mol.Biol. 202, 913-915:1988) の少なくとも一部を変異させ、この変異遺伝子を植物の蒴で特異的に発現させたとき、蒴以外の組織に対して実質的に不利な影響を及ぼすことなく、当該植物を実質的に雄性不稔化することができるようにする。

#### 【0010】

変異の方法は、部位特異的変異形成法、制限酵素による一部断片の削除、Low Fidelity PCR法などの公知の方法で行うことができる。好ましい変異方法は、Low Fidelity PCR法である (D. Leung, E. Chen and D.Goedda, Technique 1, 11-15:1989; Y.Z. Xiaoping and R.H. Ebright, Nucleic Acid Res. 19, 6052:19

91; G.C. Rice et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 5467-5471:1992)。この技法を用い、増幅時の反応を複数エラーの起きやすい条件下で行うことで、目的のDNA断片に効率よくランダム変異を導入することが可能である。

【0011】

本発明においてLow Fidelity PCR法に用いるプライマーは、通常のPCR法と同様にして選択する。プライマーの長さは通常のPCR法と同様の塩基数であることが好ましい。

【0012】

本発明者らは、配列番号1の配列を含むDNAを鋳型に用いプライマー1 (5'-CGTTCGGCTC GATGGTACCG GTTATCAACA CGTTTGA-3'、配列番号6)、プライマー2 (5'-CCTCTAGATT ATCTGATTTT TGTAAGGTC TGATAATG-3'、配列番号7)の組合せでPCRを行ない、配列番号3に示されるDNA配列を有する変異バルナーゼ遺伝子を単離することができた。

【0013】

配列番号1の配列は、公知のプロテオミドVF108 (W092/13956)上に存在するバルナーゼ遺伝子のコーディング領域の配列であり、本来のバルナーゼ遺伝子の配列からN末端側の菌体外への分泌シグナルに当たる不要な部分を取り除いたものである。

【0014】

同様の方法で、さらに異なる変異バルナーゼ遺伝子を得ることも可能である。

【0015】

PCR増幅産物は、慣用の技術によって、大腸菌等の宿主中でクローニングし、変異バルナーゼ遺伝子を含む大腸菌クローンを単離する。このクローニングにおいて、バルナーゼ遺伝子を有するクローンは、該遺伝子の発現により生じるRNase活性の測定によりスクリーニングしてもよいが、バルナーゼの有するRNase活性により、大腸菌の成長が影響を受けることを利用して、以下に述べる2工程からなる方法によりスクリーニングするのが都合がよい。

## 【0016】

第一の工程では、まず、上述のようにして得た変異バルナーゼ遺伝子を用いてプラスミドを調製し、これにより大腸菌を形質転換する。このようにして得られた大腸菌形質転換株は、導入された変異バルナーゼの活性により成長が抑制される。この事実に基づき、変異バルナーゼを導入していない対照ベクターを導入した大腸菌株と比較して、成長の遅い、すなわちコロニーの大きさが小さいコロニーを選抜する。このようにして選抜された大腸菌株は、変異バルナーゼ遺伝子を含むことが予想されるが、確実に変異バルナーゼ遺伝子が発現することにより成長抑制が起こっていることを確認するために、次いで第二の工程を行う。

## 【0017】

第二の工程においては、バースター遺伝子を用いる。バースターは、前述したようにバルナーゼに対して拮抗作用を有する酵素である。バースターを発現させた大腸菌中では、バルナーゼの酵素活性が阻害され、バルナーゼ存在下ではその活性により分解されるはずのmRNAの分解を阻害することができる。その結果、バースター遺伝子を発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子により形質転換した場合には、その生育が抑制されないことになるので、バースター遺伝子を発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子を含まない対照プラスミドにより形質転換した場合と成長速度を比較すると、両者の成長速度に大きな差はなく、したがってコロニーのサイズは大きく変化しないと期待される。これに基づき、第一の工程で選抜した大腸菌からプラスミドを調製し、これを用いてバースター遺伝子を構成的に発現させた大腸菌を形質転換し、対照プラスミドにより形質転換した大腸菌と同程度のサイズのコロニーを、変異バルナーゼ遺伝子を含むコロニーとして選択する。

## 【0018】

こうして得られた変異バルナーゼ遺伝子は、必要であれば、慣用の方法によってDNA配列を解析することで、その変異の詳細を調べることができる。

## 【0019】

本発明の変異バルナーゼ遺伝子の好ましい一例は、配列番号3のDNA配列を有する。この遺伝子がコードする塩基配列は、野生型活性を示す配列番号1の塩

基配列と比較すると、開始コドンであるATGのAから数えて15番目にTの挿入があり、また333番目のAが欠失している。この配列番号3のDNA配列に基づいてタンパク質の翻訳が行われた場合、9番目コドンに終止コドンがあらわれるため理論的には8アミノ酸からなるポリペプチドしか生成されず、そのため生成される変異バルナーゼタンパク質はRNA分解酵素活性を有さない可能性が考えられる。しかしながら、配列番号3に基づくタンパク質を発現させたとき、バルナーゼ活性を有するタンパク質が生成されている。本発明においては、タンパク質への翻訳過程でリボソームが自動的に読み枠をずらして翻訳する、フレームシフトリコーディング (Frame Shift Re-coding) と呼ばれる現象が起こっている可能性がある。この現象はウイルス、大腸菌、動物のいくつかの遺伝子において見つかっている。この現象が起こる結果、読み枠のずれに伴う翻訳効率の低下が生じ、そのために低活性になっていることが考えられる。

#### 【0020】

さらに、配列番号3のDNA配列中の塩基の一つまたは複数が置換、欠失、挿入、付加されても、配列番号3の遺伝子と同様に、植物で特異的に発現させたとき、当該植物を実質的に雄性不稔化することができる変異遺伝子が存在すると考えられ、そのような変異遺伝子も配列番号3のものと同様に本発明において好ましい。

#### 【0021】

変異バルナーゼ遺伝子により、雄性不稔化することができる植物としては、本遺伝子が導入され、実質的に雄性不稔化できる植物であれば、特に限定されないが、具体例を挙げると例えばイネ、トウモロコシ、タバコ、レタス、ナタネなどを挙げることができる。この中で特に、イネおよびトウモロコシが好ましい。

#### 【0022】

植物を雄性不稔化するためには、変異バルナーゼ遺伝子を当該植物の葯で特異的に発現させ、そのRNase活性によって葯の機能を阻害する。葯で特異的に発現させるためには、W092/13957に記載されている方法を用いることができる。簡単に述べると、変異バルナーゼ遺伝子を、葯特異性のプロモーターの下流に連結

して、発現ベクターを用いて植物細胞に組み込む。

【0023】

組み込みのためには、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などがある。

【0024】

形質転換した植物細胞から植物体を形成するためには、形質転換した植物細胞カルスから再生する。その方法は、Y. Hiei et al., Plant J. 6, 271-282:1994の様にすればよい。

【0025】

このようにして作出した植物体が、雄性不稔化されていることは、これらの植物体を栽培しても、稔性のある花粉を他の植物体から受粉しない限り稔実しないことから確認することができる。

【0026】

【実施例】

実施例1. 変異バルナーゼ遺伝子の調製

Low fidelity PCR

プライマー1 (CGTTCGGCTC GATGGTACCG GTTATCAACA CGTTTGA、配列番号6) およびプライマー2 (CCTCTAGATT ATCTGATTTT TGTAAGGTC TGATAATG、配列番号7) を、S.L. Beaucage et al., Tetrahedron Lett., 22, 1859-1862:1982に記載の方法でDNA合成装置（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて合成した。公知のプラスミドpVE108 (W092/13956) を鋳型に用い、プライマー1およびプライマー2の組み合わせでPCRを行った。pVE108のバルナーゼ遺伝子のコーディング領域に対応する部分の配列を配列番号1に示す。また、反応条件は次の通りである。すなわち、10mM Tris-HCl (pH9.5)、50mM KCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、それぞれ1mMのdNTP、10ngの鋳型DNA、0.5unitsのTaq DNAポリメラーゼ中で、94℃ 1分、57℃ 1分、72℃ 1分を、50サイクル行った。

【0027】

反応後、増幅産物をアガロースゲル電気泳動（2% SeaKem GTG agarose, 1xTAE）で分離、DEAE-セルロース法（村松正実編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸

善、1988 pp111) により精製したものを鋳型に、上記の条件で再びPCR反応をおこなった。

【0028】

変異導入バルナーゼ遺伝子断片のプラスミドベクターへのライゲーション

反応産物を常法によりSacI、XbaIで消化後、アガロースゲル電気泳動で精製し、挿入断片を調製した。この挿入断片を大腸菌へ導入するためのプラスミドは適宜選択できるか、たとえばプラスミドpHM1を用いることができる。プラスミドpHM1は、プラスミドpBR322のEcoRI部位を切断した後T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造）を用いて平滑化後、その制限酵素部位にpUC18からPvuIIで切り出したlacZの発現カセット（322bp）を同様に平滑化した後組み込むことによって作製されたプラスミドである。

【0029】

プラスミドpHM1をSacI、XbaIで消化した後さらに仔ウシ小腸アルカリフォスファターゼ（Calf intestine alkaline phosphatase、宝酒造）により脱リン酸化して、制限酵素処理プラスミド断片を調製した。変異バルナーゼ遺伝子を含む上記挿入断片は、Takara Ligation Kit ver.1（宝酒造）を用いて制限酵素処理されたpHM1中にライゲーションした。

【0030】

大腸菌への導入とバルナーゼ活性クローンの選抜

バルナーゼ遺伝子が導入された大腸菌は、たとえば次のようにして選抜する。すなわち、バルナーゼの活性により細胞内でmRNAが分解されるため、タンパク質の合成が低下して、結果として大腸菌の成長が抑制される。したがって、変異バルナーゼ遺伝子を含まない対照プラスミドで形質転換した大腸菌コロニーと比較してコロニーサイズが小さくなることを利用して、バルナーゼ遺伝子により形質転換された大腸菌を選択することができる。なお、野生型バルナーゼ若しくは同等の活性を保持した変異バルナーゼをpHMに組み込んだ場合には、大腸菌はコロニーを形成できないため、十分に活性の弱まったクローンのみを選択することが可能である。

## 【0031】

そこで、変異バルナーゼ遺伝子をライゲーションしたプラスミドをエタノール沈殿した後、このプラスミドをGenePulser (BioRad) を用いたエレクトロポレーション法により、大腸菌LE392株に導入した。導入手順はBioRad社のマニュアルに従っておこなった。同様の手順にしたがって、変異バルナーゼを含まない対照プラスミドも大腸菌LE392株に導入した。

## 【0032】

その後、これらの形質転換された大腸菌をテトラサイクリン ( $25\mu\text{g/ml}$ ) を含むLB寒天培地にプレーティングし、室温 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) で72時間培養後、対照となるプラスミドpHM1を導入した大腸菌のコロニーと比較してコロニーサイズの小さいコロニーを、変異バルナーゼが導入されたプラスミドを含む大腸菌のコロニーとして選抜した (表1のA)。

## 【0033】

バースター遺伝子による変異バルナーゼクロンの選抜

バースターは、前述したようにバルナーゼに対して拮抗作用を有する酵素である。バースターを発現させた大腸菌中では、バルナーゼの酵素活性が阻害され、バルナーゼ存在下ではその活性により分解されるはずのmRNAの分解を阻害することができる。その結果、バースターを発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子を挿入したプラスミドにより形質転換した場合には、その生育が抑制されないのので、バースターを発現させた大腸菌をバルナーゼ遺伝子含まない対照プラスミドにより形質転換した場合と成長速度を比較した場合、その成長速度は両方で大きな差はなく、したがってコロニーのサイズは大きく変化しないと期待される。

## 【0034】

この大腸菌は以下のように作成した。R.W. Hartley, J.Mol.Biol. 202, 913-915:1988に記載のバースター遺伝子をHindIIIとXbaIできりだし、tacプロモーター (de Boer et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 21-25:1983) とインフレーションで結合し、さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子 (N.K. Alton, and D. Vapnek, Nature 282, 864-869:1979) とともに (Herrero et al., J.Bacteriol. 172, 6557-6567:1990) に記載のベクター上の、転移酵素を欠損したトランスポ

ゾン (defective transposon) の内部に結合し、その後、得られたプラスミドを大腸菌MC1061株へ導入し、このトランスポゾン (バースター遺伝子カセットを含む。) を当該大腸菌染色体に転移させた。この大腸菌が安定してバースター遺伝子カセットを維持していることはクロラムフェニコール耐性により確認することが可能である。また大腸菌MC1061株ではlacI遺伝子が欠損しているため、tacプロモーターは常に誘導されており、バースター遺伝子は構成的 (constitutive) に発現することとなる。

## 【0035】

エレクトロポレーション法により変異バルナーゼ遺伝子を挿入断片として含むプラスミド、またはそれを含まない対照のプラスミドを大腸菌に導入した後、これら的大腸菌をIPTG (1mM)、テトラサイクリン (25  $\mu$ g/mL) を含むLB寒天培地にプレーティングし、25℃で72時間培養した。その後、変異バルナーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌のコロニーの中から、同時に平板培養を開始した対照プラスミドpHM1導入大腸菌コロニーと比較して、コロニーの大きさが変わらないコロニー (“#4-31” と命名) を選抜した (表1のB)。

## 【0036】

【表1】

選抜クローンとコロニーの大きさ (mm)

	選抜クローン	pHM1 (対照)
A : E.coli LE392 * <sup>1</sup>	1.77 $\pm$ 0.33	2.65 $\pm$ 0.47
B : バースター遺伝子を 発現させたE.coli * <sup>2</sup>	1.39 $\pm$ 0.10	1.55 $\pm$ 0.08

\*1 : LB寒天プレート (25  $\mu$ g/mL テトラサイクリン) 上で28℃、48時間培養後のコロニーの大きさ



\*2: LB寒天プレート (25ug/mL テトラサイクリン) 上で28℃、24時間培養後のコロニーの大きさ

## 実施例2. 変異バルナーゼ遺伝子の塩基配列の決定

実施例1で選抜した大腸菌から、本発明の目的に適したクローン化された変異バルナーゼ遺伝子を調製した。まず、実施例1で選抜したクローン#4-31を調製した。次いでクローン#4-31に組み込まれた変異バルナーゼ遺伝子断片をKpnI、XbaIで切り出し、同様にKpnI、XbaIで切断したpUC119のKpnI、XbaIサイトにライゲーションした。このプラスミドを大腸菌を用いて増幅させた後、Taqポリメラーゼを用いたサイクルシーケンス法を用いて (Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Inc.)、メーカーのプロトコルに従って反応を行い、次いでApplied Biosystems社製のDNAシーケンサー (Model 373A) で配列を解析した。その結果、配列番号3に示す配列を得た。この配列は、本来のバルナーゼ遺伝子のDNA配列と比較して、開始コドンであるATGのAから数えて15番目にTの挿入があり、また333番目のAが欠失している。

【0037】

## 実施例3. 弱毒性変異バルナーゼ遺伝子を用いた雄性不稔イネの作成

上述したようにpUC119に組み込んだ弱毒性変異バルナーゼ遺伝子を、プラスミドを制限酵素XbaI、KpnIで切断して利用し、配列番号5に示すプラスミドベクターpTS431を構築した。pTS431は既知のプラスミドであるpVE108プラスミド (PC T出願国際公開第9213956号) とは以下の点に相違があるが、薬特異のプロモーターと変異バルナーゼ部分を除き、実質的に等価であると考えられる。

【0038】

(1) pVE108プラスミドではバルナーゼ遺伝子 (配列番号1) を導入していた部分が、本発明のpTS431では変異バルナーゼ遺伝子 (配列番号3) に変更されている。

【0039】

(2) pVE108プラスミドではタバコ由来の薬特異のプロモーターを使用してい

たが、本発明のpTS431ではイネE1遺伝子（PCT出願国際公開第9213956号）由来の  
 薬特異的プロモーターに変更している。

【0040】

(3) 本発明では、バルナーゼ遺伝子上流にpVE108プラスミドでは使用され  
 ていなかった1376bpの35S3プロモーター（EP 0344029）を用いている。

【0041】

(4) 本発明では、バルナーゼ遺伝子下流部にpVE108プラスミドでは使用さ  
 れていなかったpJD884（PCT出願国際公開第9309218号）から切り出したAgrobact  
 erium T-DNA gene7の下流部由来の配列を用いている。

【0042】

(5) 本発明では、pUC19に由来する部分からlacZに相当する領域を取り除い  
 ている。なお、変異型ではなく、従来型のバルナーゼ遺伝子を組み込んだプラス  
 ミド（pTS172）を配列番号4に示す。

【0043】

pTS172（変異バルナーゼ遺伝子導入プラスミド、配列番号5） pTS172（バ  
 ルナーゼ遺伝子導入プラスミド、配列番号4）から制限酵素EcoRIによりそれぞ  
 れ約4.5kbpの断片を切り出し、中間ベクター pSB11（T. Komari et al., Plant  
 J. 10(1), 165-174:1996）の EcoRI 部位に挿入し、さらに相同組換えによりそ  
 のT-DNA 領域をacceptor vector pSB1（T. Komari et al., Plant J. 10(1), 16  
 5-174:1996）に組み込んだ。この組換え型プラスミド（それぞれpSB1431、pSB1172  
 ）をもつAgrobacterium tumefaciens LBA4404をイネ（品種アサノヒカリ）の形  
 質転換に用いた。形質転換の方法は、基本的に樋江井らの方法（Plant J. 6(2),  
 271-282:1994）に従ったが、構築した雄性不稔遺伝子が選抜マーカーとしてbar  
 遺伝子（phosphinithricine acetyl transferaseをコードする）を含んでいるの  
 で、形質転換の際の選抜には、形質転換は選抜にphosphinothricine（濃度10mg/  
 L）を用いた。phosphinothricineは、遺伝子が導入されたカルスを選抜するた  
 めに用いる。

【0044】

イネにおいて、野生型バルナーゼ遺伝子を利用した場合と変異バルナーゼ遺伝子

を利用した場合とを比較すると、形質転換の効率、形態の正常な雄性不稔形質転換の割合は表2のように変異バルナーゼの導入により顕著に改善された。

【0045】

【表2】

形質転換効率

	感染 カルス数	再分化 カルス数	PCR陽性 系統数* <sup>1</sup>	形態の正常な 雄性不稔系統数
pSB1172 (対照)	2838	83	52/83	9/52 (17.3%)
pSB1431 (対照)	787	69	43/45* <sup>2</sup>	27/28* <sup>3</sup> (96.4%)

\*1：PCRによりバルナーゼの断片遺伝子を検出

\*2：69系統のうち45系統のみ調査

\*3：43系統のうち28系統のみ調査

【0046】

【発明の効果】

本発明において、変異により効果を弱めたバルナーゼ遺伝子を作成し、これを用いた雄性不稔遺伝子を植物に導入することにより、バースター遺伝子を用いずに、単一の遺伝子により、好ましくない形質を持たない雄性不稔植物を効率よく得ることに成功した。

【0047】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Tobacco Inc.

&lt;120&gt; 変異バルナーゼ遺伝子およびその形質転換植物

&lt;130&gt; 980687

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 343

&lt;212&gt; DNA

<213> *Penicillium anuloliquifaciens*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; NAME/KEY: CDS

&lt;222&gt; 1..336

&lt;400&gt; 1

atg gta ccg gtt atc aac acg ttt gac ggg gtt gcg gat tat ctt cag 48

Met Val Pro Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val Ala Asp Tyr Leu Gln

1 5 10 15

aca tat cat aag cta cct gat aat tac att aca aaa tca gaa gca caa 96

Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr Lys Ser Glu Ala Gln

20 25 30

gcc ctc ggc tgg gtg gca tca aaa ggg aac ctt gca gac gtc gct ccg 144

Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val Ala Pro

35 40 45

ggc aaa agc atc ggc gga gac atc ttc tca aac agg gaa ggc aaa ctc 192  
 Gly Lys Ser Ile Gly Gly Asp Ile Phe Ser Asn Arg Glu Gly Lys Leu  
 50 55 60  
 ccg ggc aaa agc gga cga aca tgg cgt gaa gcg gat att aac tat aca 240  
 Pro Gly Lys Ser Gly Arg Thr Trp Arg Glu Ala Asp Ile Asn Tyr Thr  
 65 70 75 80  
 tca ggc ttc aga aat tca gac cgg att ctt tac tca agc gac tgg ctg 288  
 Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 att tac aaa aca acg gac cat tat cag acc ttt aca aaa atc aga taa 336  
 Ile Tyr Lys Thr Thr Asp His Tyr Gln Thr Phe Thr Lys Ile Arg  
 100 105 110  
 ggtaacc 343

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquifaciens

<400> 2

Met Val Pro Val Ile Asn Thr Phe Asp Gly Val Ala Asp Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Tyr His Lys Leu Pro Asp Asn Tyr Ile Thr Lys Ser Glu Ala Gln  
 20 25 30  
 Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Lys Gly Asn Leu Ala Asp Val Ala Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Ser Ile Gly Gly Asp Ile Phe Ser Asn Arg Glu Gly Lys Leu  
 50 55 60  
 Pro Gly Lys Ser Gly Arg Thr Trp Arg Glu Ala Asp Ile Asn Tyr Thr

65	70	75	80
Ser Gly Phe Arg Asn Ser Asp Arg Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Trp Leu			
	85	90	95
Ile Tyr Lys Thr Thr Asp His Tyr Gln Thr Phe Thr Lys Ile Arg			
100	105	110	

<210> 3

<211> 342

<212> DNA

<213>

<400> 3

```

atggtaccgg ttattcaaca cgtttgacgg ggttgcgat tatcttcaga catatcataa 60
gctacctgat aattacatta caaaatcaga agcacaagcc ctcggctggg tggcatcaaa 120
aggaaccit gcagacgicg ctccggggaa aagcatcgcc gagacatct tctcaaacag 180
ggaaggcaaa ctcccgggca aaagcggacg aacatggcgt gaagcggata ttaactatac 240
atcaggcttc agaaattcag accggattct ttactcaagc gactggctga ttacaaaac 300
aacggaccat tatcagacct ttacaaaaat cagtaatcta ga 342
  
```

<210> 4

<211> 6548

<212> DNA

<213> Escherichia coli LE392

<220>

<223> Clone: pTS172

<400> 4

```

aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60
ttatttttct aaatacatc aaatatgtat cgcctcatga gacaataacc ctgataaatg 120
  
```

ctccaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 180  
 cccittttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 240  
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300  
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360  
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc 420  
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480  
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540  
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac 600  
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata 660  
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 720  
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 780  
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 840  
 aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900  
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 960  
 aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 1020  
 gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag 1080  
 gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 1140  
 cactgagcgt cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 1200  
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg 1260  
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1320  
 aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1380  
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc 1440  
 tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1500  
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1560  
 ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaaggc ggacaggtat 1620  
 ccggtaaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1680  
 tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
 tgctcgtcag gggggcgag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc 1800  
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 1860

gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataaccgtc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
 cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
 gcgcgttggc ctgatacaga ttcatatgca cgtgttcccc atctagtaac atagatgaca 2040  
 ccgcgcgcga taatttatcc tagtttgccg gctatatatt gttttctatc gcgtattaaa 2100  
 tgtataattg cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca 2160  
 tgtaattat tacaatgcta acgtaattca acagaaatta tatgataatc atcgcaagac 2220  
 cggcaacagg attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tctgttccgg 2280  
 aggttacctt atctgatttt tgtaaaggct tgataatggc ccgttggttt gtaaatcagc 2340  
 cagtcgcttg agtaaagaat ccggtctgaa ttctgaagc ctgattgata gttaatatcc 2400  
 gcttcacgcc atgttcgtcc gcttttggcc gggagtttgc ctccctgtt tgagaagatg 2460  
 tctccgccga tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggc tcccttttga tgccaccag 2520  
 ccgagggtt gtgcttctga ttttgtaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga 2580  
 agataatccg caaccccgct aaacgtgttg ataaccggta ccatcgcgac ggcttgatgg 2640  
 atctcttgcg ggacaccggg atgctaggat gggttatcgt ggccggcgct cgtgtgtggc 2700  
 ttttataggc gccggcgacg gccggcgacg tctgcaaggc cgttcacgtt gcaagcgctc 2760

gcaagtgact gcaacaacca aggacggctc tggcgaaagc acctcacgcg tccaccgtct 2820  
 acaggatgta gcagtagcac ggtgaaagaa gtgtgtccc gtccattagg tgcatctca 2880  
 ccgttgacca gaacaggacc gttcaacagt taggttagt gtaggacttt tacgtggta 2940  
 atgtatggca aatagtagta aattttgccc ccattggctt ggctgagata gaacatatc 3000  
 tggaaagcct ctagcatatc tttttgaca gctaaacttt gcttcttgcc ttcttggtct 3060  
 agcaatgacg ttgccatgt cgtggcaaac atctggttag gtaactgtat tcgtttgttc 3120  
 cttcaacgg ctcaatcccc acaggccaag ctatccttc ctggcagta taggctcctt 3180  
 gagagattat actaccattt ttaagtgcct ataaagacga tgctctctaa ccagatcgat 3240  
 cagaaacaca aagttttagc agcgtaatat cccacacaca tacacacacg aagctatgcc 3300  
 tctcatttt ccgagagatt ctgacagtga ccagaatgtc agaatgcat ttcatgggca 3360  
 caagtcgatc cacaagcttc ttgggtggagg tcaagggtgt ctattattat tcgctttcta 3420  
 ggaaattatt cagaattagt gccttttctc ataacttctc tctgagccga tgtggttttg 3480  
 gatttcattg ttgggagcta tgcagttgcg gatattctgc tgtggaagaa caggaaacta 3540  
 tctgcggggg tccttgctgg ggcaacattg atatggttcc tggtcgatgt agtagaatac 3600



aatataattc cgctcctttg ccagattgcc attcttgcca tgcttgtgat cticatttgg 3660  
tcaaagtcgc caccactctt ggacaggtat tagctttatt tcctgtggag atggtagaaa 3720  
actcagctta cagaaatggc atttcacgta gtataacgca agacattagg tactaaaact 3780  
caactaactg tttccgaatt tcagggcccc tccaaggatc ccagaaatca tcatctctga 3840  
acatgccttc agagaaatgg cattgaccgt ccattacaaa ctaacgtaca ctgtatctgt 3900  
tctttacgac attgcatgtg gaaaggatct gaagagattt ctcttggtac ataataatct 3960  
actcctttgc tacgttaata agagatgtaa aaacatgcaa cagttccagt gccaacattg 4020  
tccaaggatt gtgcaattct ttctggagcg ctaaaatga ccagattaga cgcatcagaa 4080  
tattgaattg cagagttagc caataatcct cataatgtta atgtgctatt gttgttact 4140  
actcaatata gttctggact aacaatcaga ttgtttatga tattaagggtg gttggatctc 4200  
tattgggtatt gtcggcgatt ggaagtctt gcagcttgac aagtctacta tatattggta 4260  
ggtattccag ataaatatta aattttaata aaacaatcac acagaaggat ctgcggccgc 4320  
tagcctaggc ccggggccac aaaaatctga gcttaacagc acagttgctc ctctcagagc 4380  
agaatcgggt attcaacacc ctcatatcaa ctactacgtt gtgtataacg gtccacatgc 4440  
cggatatatac gatgactggg gttgtacaaa ggcggaaca aacggcgttc ccggagttgc 4500  
acacaagaaa ttigccacta ttacagaggc aagagcagca gctgacgcgt acacaacaag 4560  
tcagcaaaac gacaggttga acttcatccc caaaggagaa gctcaactca agcccaagag 4620  
ctttgctaag gccctaaca gcccaccaa gcaaaaagcc cactggctca cgctaggaac 4680  
caaaaggccc agcagtgatc cagccccaaa agagatctcc ttgccccgg agattacaat 4740  
ggacgatttc ctctatctt acgatctagg aaggaagttc gaaggtgaag gtgacgacac 4800  
tatgttcacc actgataatg agaagggttag cctcttcaat ttcagaaaga atgctgaccc 4860  
acagatgggt agagaggcct acgcagcagg tctcatcaag acgatctacc cgagtaacaa 4920  
tctccaggag atcaaatacc ttccaagaa ggttaaagat gcagtcaaaa gattcaggac 4980  
taattgcatc aagaacacag agaaagacat atttctcaag atcagaagta ctattccagt 5040  
atggacgatt caaggcttgc ttcataaacc aaggcaagta atagagattg gagtctctaa 5100  
aaaggtagtt cctactgaat ctaaggccat gcatggagtc taagattcaa atcgaggatc 5160  
taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg 5220  
acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg agcacgacac tctgggtctac tccaaaaatg 5280  
tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaaca aggataattt 5340

cgggaaacct cctcggattc cattgccag ctatctgtca cttcatcgaa aggacagtag 5400  
 aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcattcaag 5460  
 atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa 5520  
 aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgacatc tccactgacg 5580  
 taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt 5640  
 catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct cttctataaat ctatctctct 5700  
 ctctataacc atggaccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga 5760  
 catgccggcg gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg 5820  
 taccgagccg caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta 5880  
 tccctggctc gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgccctac cgggcccctg 5940  
 gaaggcacgc aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct cccccgcca 6000  
 ccagcggacg ggactgggct ccacgctcta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca 6060  
 gggcttcaag agcgtggctg ctgtcatcgg gctgccaac gaccgagcg tgcgcatgca 6120  
 cgaggcgctc ggatatgccc cccgcggcat gctgcggcg gccggcttca agcacgggaa 6180  
 ctggcatgac ctgggtttct ggcagctgga ctgcagcctg cccgtaccgc cccgtccggt 6240  
 cctgcccgtc accgagatct gagatcacgc gttctaggat ccccgatga gctaagctag 6300  
 ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatgcactc agtctttcat ctacggcaat 6360  
 gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat ttaaacttgc atcaataaat 6420  
 ttatgttttt gcttggacta taatacctga ctgtttatt tatcaataaa tatttaaact 6480  
 atatttcttt caagatggga attaacatct acaaattgcc ttttcttata gaccatgtac 6540  
 gtatcgcg 6548

<210> 5

<211> 6539

<212> DNA

<213> Escherichia coli LE392

<220>

<223> Clone: pTS431

<400> 5  
aattcaagct tgacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 60  
ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgtcatga gacaataacc ctgataaatg 120  
cttcaataat attgaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt 180  
ccctttttg cggcattttg ccttccgtgt ttgtctcacc cagaaacgtt ggtgaaagta 240  
aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 300  
ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa 360  
gttctgctat gtggcgcggt attatccgtt attgacgccg ggcaagagca actcgggtcgc 420  
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 480  
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact 540  
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgac 600  
aacatggggg atcatgtaac tcgcttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 660  
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatccct gtagcaatgg caacaacgtt ggcgaacta 720  
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggagcg 780  
gataaagttg caggaccact tctgcgtcgc gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 840  
aaatciggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 900  
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat gtcagacca 960  
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag 1020  
gtgaagatcc tttttggctc gagtctcatg accaaaatcc cttacagtga gttttcgtt 1080  
cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg 1140  
gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 1200  
aatactgtcc tictagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 1260  
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 1320  
tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 1380  
acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 1440  
ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg ctcccgaag ggagaaagc ggacaggtat 1500  
ccggtaaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 1560  
1620  
1680

tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 1740  
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc 1800  
 ctggccittt gctggccttt tgctcacatg ttctttccig cgttatcccc tgattctgtg 1860  
 gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 1920  
 cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 1980  
 gcgcgttggc ctgatcagaa ttcttcccga tctagtaaca tagatgacac cgcgcgcat 2040  
 aatttatcct agtttgcgcg ctatatittg ttttctatcg cgtattaaat gtataattgc 2100  
 gggactctaa tcataaaaac ccatctcata aataacgtca tgcattacat gttaattatt 2160  
 acatgcitaa cgtaattcaa cagaaattat atgataatca tcgcaagacc ggcaacagga 2220  
 ttcaatctta agaaacttta ttgccaaatg ttgaacgat ctgcttcgga tcctctagat 2280  
 tactgatttt tgtaaaggtc tgataatggt ccgttgtttt gtaaatacgc cagtcgcttg 2340  
 agtaaagaat ccggtctgaa tttctgaagc ctgatgtata gttaatatcc gcttcacgcc 2400  
 atgttcgtcc gcttttgccc gggagtttgc ctccctgtt tgagaagatg tctccgccga 2460  
 tgcttttccc cggagcgacg tctgcaaggt tcccttttga tgccaccag ccgagggctt 2520  
 ctgcttctga ttttgaatg taattatcag gtagcttatg atatgtctga agataatccg 2580  
 caaccccgtc aaacgtgttg aataaccggt accatcgca cggcttgatg gatctcttgc 2640  
 tggacaccgg gatgctagga tgggttatcg tggccggcgt gcgtgtgtgg cttttgtagg 2700  
 cgccggcgac ggCgggggca atgtggcagg tgagtcacgg tgcaagcgtg cgcaagtgc 2760  
 tgcaacaacc aaggacggtc atggcgaag cacctcacgc gtccaccgtc tacaggatgt 2820  
 agcagtagca cgggtgaaaga agtggtgtcc cgtccattag gtgcattctc accgttggcc 2880  
 agaacaggac cgttcaacag ttaggttag tgtaggactt ttacgtggtt aatgtatggc 2940  
 aaatagtagt aaattttgcc ccatttggc tggctgagat agaacatatt ctggaaagcc 3000  
 tctagcatat cttttttgac agctaaactt tgcttcttgc cttcttggtc tagcaatgac 3060  
 gttgcccatg tcgtggcaaa catctggtaa ggtaactgta ttctgttgtt cccttcaacg 3120  
 gctcaatccc cacaggccaa gctatccttt ccttggcagt ataggctcct tgagagatta 3180  
 tactaccatt ttttaagtgt tataaagacg atgctctcta accagatcga tcagaaacac 3240  
 aaagttttag cagcgttaata tcccacacac atacacacac gaagctatgc ctctcattt 3300  
 tccgagagat tctgacagt accagaatgt cagaatgcc tttcatgggc acaagtcgat 3360  
 ccacaagctt cttggtggag gtcaagggtg gctattatta ttcgctttct aggaaattat 3420

tcagaattag tgccttttat cataacttct ctctgagccg atgtggtttt ggatttcatt 3480  
 gttgggagct atgcagttgc ggatattctg ctgtggaaga acaggaactt atctgcgggg 3540  
 gtccttgctg gggcaacatt gatatggttc ctgttcgatg tagtagaata caatataatt 3600  
 ccgctccttt gccagattgc cattcttgcc atgcttgtga tcttcatttg gtcaaatgcc 3660  
 gcaccactct tggacaggta ttagctttat ttcctgtgga gatggtagaa aactcagctt 3720  
 acagaaatgg catttcacgt agtataacgc aagacattag gtactaaaac tcaactaact 3780  
 gtttccgaat ttcagggcc cccaaggat cccagaaatc atcatctctg aacatgcctt 3840  
 cagagaaatg gcattgaccg tccattacaa actaacgtac actgtatctg ttcctttacga 3900  
 cattgcatgt ggaaaggatc tgaagagatt tctcctggta cataataatc tactcctttg 3960  
 ctacgttaat aagagatgta aaaacatgca acagttccag tgccaacatt gtccaaggat 4020  
 tgtgcaattc tttctggagc gctaaaattg accagattag acgcatcaga atattgaatt 4080  
 gcagagttag ccaataatcc tcataatgtt aatgtgctat tgttggtcac tactcaatat 4140  
 agttctggac taacaatcag attgtttatg atattaaggt ggttggatct ctattgggat 4200  
 tgtcggcgat tggaagttct tgcagcttga caagtctact atatatgggt aggtattcca 4260  
 gataaatatt aaattttaat aaaacaatca cacagaagga tctgcggccg ctagcctagg 4320  
 cccgggccca caaaaatctg agcttaacag cacagttgct cctctcagag cagaatcggg 4380  
 tattcaacac cctcatatca actactacgt tgtgtataac ggtccacatg ccggtatata 4440  
 cgatgactgg ggttggtacaa aggcggcaac aaacggcggt cccggagttg cacacaagaa 4500  
 atttgccact attacagagg caagagcagc agctgacgcg tacacaacaa gtcagcaaac 4560  
 agacaggttg aacttcatcc ccaaaggaga agctcaactc aagcccaaga gctttgctaa 4620  
 ggccctaaca agcccaccaa agcaaaaagc ccactggctc acgctaggaa ccaaaaggcc 4680  
 cagcagtgat ccagcccca aagagatctc ctttgccccg gagattacaa tggacgattt 4740  
 cctctatctt tacgatctag gaaggaggtt cgaagggtgaa ggtgacgaca ctatgttcac 4800  
 cactgataat gagaaggta gcccttcaa tttcagaaag aatgctgacc cacagatggt 4860  
 tagagaggcc tacgcagcag gtctcatcaa gacgatctac ccgagtaaca atctccagga 4920  
 gatcaaatac cttcccaaga aggttaaaga tgcagtcaaa agattcagga ctaattgcat 4980  
 caagaacaca gagaaagaca tatttctcaa gatcagaagt actattccag tatggacgat 5040  
 tcaaggcttg cttcataaac caaggcaagt aatagagatt ggagtctcta aaaaggtagt 5100  
 tcctactgaa tctaaggcca tgcattggagt ctaagattca aatcgaggat ctaacagaac 5160

tcgccgtgaa gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga 5220  
 aaatcttcgt caacatgggtg gagcacgaca ctctgggtcta ctccaaaaat gtcaaagata 5280  
 cagtctcaga agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aaggataatt tcgggaaacc 5340  
 tcctcggatt ccattgcccc gctatctgtc acttcatcga aaggacagta gaaaaggaag 5400  
 gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcattcaa gatgcctctg 5460  
 ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg 5520  
 ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgacat ctccactgac gtaagggatg 5580  
 acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc ctctctctat ataaggaagt tcatttcatt 5640  
 tggagaggac acgctgaaat caccagtctc tctctataaa tctatctctc tctctataac 5700  
 catggacca gaacgacgcc cggccgacat ccgccgtgcc accgaggcgg acatgccggc 5760  
 ggtctgcacc atcgtcaacc actacatcga gacaagcacg gtcaacttcc gtaccgagcc 5820  
 gcaggaaccg caggagtggg cggacgacct cgtccgtctg cgggagcgt atccctggct 5880  
 cgtcgccgag gtggacggcg aggtcgccgg catcgcttac gcgggcccct ggaaggcacg 5940  
 caacgcctac gactggacgg ccgagtcgac cgtgtacgtc tccccccgcc accagcggac 6000

~~gagcgtggtc gctgtcatcg ggctgcccac cgacccgagc gtgcgcatgc acgaggcgct 6120~~

gagcgtggtc gctgtcatcg ggctgcccac cgacccgagc gtgcgcatgc acgaggcgct 6120  
 cggatatgcc ccccgcgga tgctgcgggc ggccggcttc aagcacggga actggcatga 6180  
 cgtgggtttc tggcagctgg acttcagcct gccgggtaccg ccccgctccg tcctgcccgt 6240  
 caccgagatc tgagatcacg cgttctagga tccccgatg agctaagcta gctatatcat 6300  
 caatttatgt attacacata atatcgact cagtctttca tctacggcaa tgtaccagct 6360  
 gatataatca gttattgaaa tatttctgaa tttaaacttg catcaataaa tttatgtttt 6420  
 tgcttggact ataatactg acttggttatt ttatcaataa atatttaaac tatatttctt 6480  
 tcaagatggg aattaacatc tacaatttgc cttttcttat cgacatgta cgtatcgcg 6539

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 1

<400> 6

cgttcggctc gatggtaccg gttatcaaca cgtttga 37

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer 2

<400> 7

cctctagatt atctgat ttt tgtaaagg tgc tgataatg 38

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バルナーゼ遺伝子を単独で葯特異的に発現させることにより、植物に生じる好ましくない形質を伴わない雄性不稔植物を作出することを目的とする。

【解決手段】 変異を生じさせることにより活性を保持しつつも低下させたバルナーゼ遺伝子を植物に導入し、葯特異的に発現させることにより、効率よく雄性不稔植物の形質転換体を得る。

【選択図】 なし



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000004569  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号  
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】 申請人  
【識別番号】 100089705  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 社本 一夫

【選任した代理人】  
【識別番号】 100071124  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】  
【識別番号】 100076691  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】  
【識別番号】 100075236  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】  
【識別番号】 100075270  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】  
【識別番号】 100092886  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 村上 清

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号  
氏 名 日本たばこ産業株式会社

---